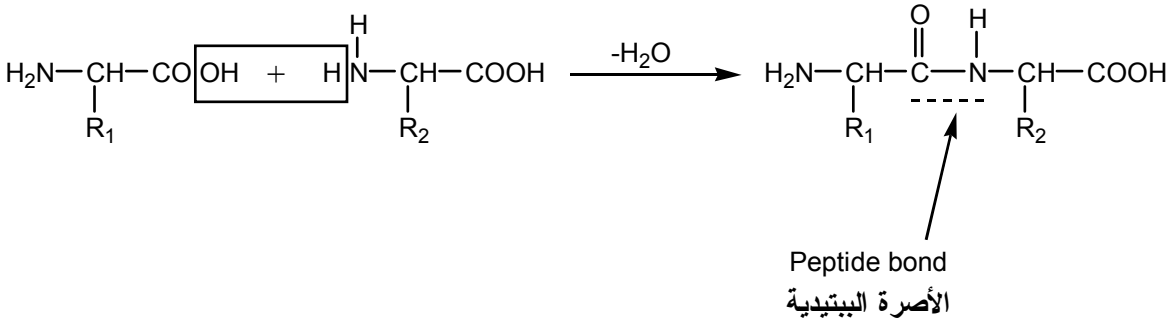
البروتينات Proteins

البروتينات: هي عبارة عن مركبات بوليمرية جزيئية كبيرة وهي مواد عضوية غير بسيطة معقدة التركيب ومتكونة من وحدات من الأحماض الأمينية مرتبطة بأواصر خاصة تدعى بالأواصر الببتيدية (Peptide bond).

تتألف من عناصر أساسية هي C , H , N , O وأحياناً توجد فيها عناصر أخرى مثل S , Fe , P , Cu. أوزانها الجزيئية كبيرة تتراوح ما بين (10^4 - 10^6) دالتون.

تتكون البروتينات من تكاثف ألفا–كاربوكسيل (α-COOH) للحامض الأميني الأول مع ألفا–أمينو (α-NH_2) للحامض الأميني الثاني.



تتميز البروتينات عن الكاربوهيدرات والدهون باحتوائها على نسبة عالية من النيتروجين وتصنع البروتينات في النباتات من نترات (NO_3-H_2O-CO_2) – كبريتات $SO_4^{=}$ – فوسفات $PO_4^{\equiv}$ عبر عملية التركيب الضوئي وعمليات أخرى.

وظائف البروتينات (عزز معلوماتك من مصادر أخرى إضافة إلى مادة النظري)

1. تستخدم كمحفزات.
2. عناصر تركيبية.
3. بروتينات ناقلة.
4. هورمونات.
5. عوامل دفاعية.
6. بروتينات خازنة.
7. بروتينات متقلصة.
8. صيانة الضغط الأزموزي و pH.
9. مصدر للطاقة.

الصفات الفيزيائية للبروتينات

1) ذائبة في الماء وقليلة الذوبان في الكحول وغير ذائبة في الايثر.
2) تكون محاليلها المائية بشكل محلول غروي ضبابي حيث يترسب البروتين باستخدام عدد من المواد :

آ. أملاح كبريتات الأمونيوم المشبعة.

ب. مذيبات عضوية مثل الاسيتون والكحول.

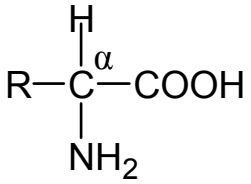
جـــ. مواد كاشفة حامضية مثل ثلاثي كلوروحامض الخليك.

د. عند نقطة التعادل الكهربائي.

3) تعطي ألوان خاصة عند تفاعلها مع كواشف معينة.

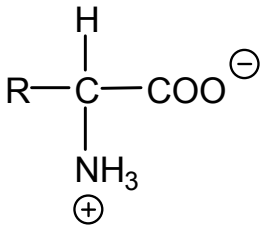
الاحماض الأمينية Amino acid

عبارة عن مركبات عضوية تحتوي على مجموعة كاربوكسيل Carboxylic group (-COOH) ومجموعة أمين Amino group (-NH_2) في الموقع الفا ولهذا سميت حوامض أمينية من نوع الفا (α).



L- amino acid

- أغلب الأحماض الأمينية الموجودة في سوائل الجسم الحي تتكون من نوع (L).
- جميع الأحماض الأمينية تمتلك ذرة كـــاربون غيـــر متماثلـــة asymmetrical (ذرة كاربون تتصل بأربعة مجاميع مختلفة) ماعدا الكلايسين.
- هناك أحماض أمينية أساسية لا يستطيع جسم الانسان تكوينه داخل جسمه لذلك يجـــب توفرها في الغذاء مثل (اللايسين – مثيونين – ثريونين – تربتوفان – فنيل الانين ...)
- جميع الأحماض الأمينية (ماعدا الكلايسين) لها القابلية على تدوير الضوء المستقطب نحو اليمين أو اليسار كونها فعالة بصرياً (Optical reactive)
- تتواجد الأحماض الأمينية داخل الجسم أو السوائل البايولوجية المتعادلة بشكل متـــأين أي أيونات ثنائية القطب (Dipolar).



H.w

- ماهو عدد الأحماض الأمينية الموجودة في جسم الكائن الحي؟ مع كتابة التراكيب الكيميائية.

- صنف الأحماض الأمينية حسب ألفة مجموعة R للماء ؟

الكشف عن عناصر البروتين [C , H , O , N , S]

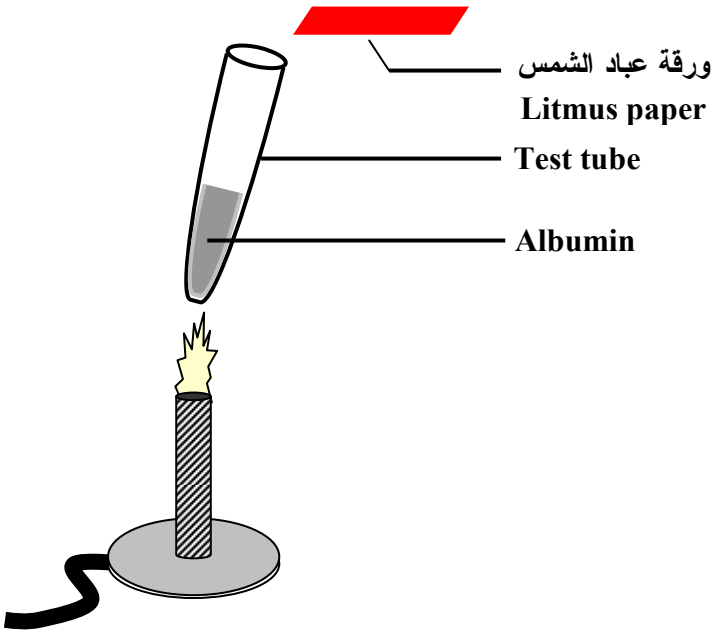
نأخذ أنبوبة اختبار جافة ونظيفة ويوضع فيها كمية مناسبة من الالبـــومين Albumin ثم نسخن مباشرة ونلاحظ النتائج الآتية:

(1) تحول ورقة عباد الشمس الحمراء (Litmus paper) المبللة بالماء إلى اللون الأزرق دلالة على تحرر غاز الأمونيا (NH_3) مما يدل على وجود النيتروجين والهيدروجين (H,N).

(2) نشوء قطرات من الماء على جدران أنبوبة الاختبار دلالة على تحرر المـــاء (H_2O) أي يدل على وجود الهيدروجين والأوكسجين (H,O).

(3) تفحم الماء المتبقية من الالبومين Albumin دلالة على وجود الكاربون (C).

(4) ظهور رائحة كريهة دلالة على تحرر غاز كبريتيد الهيدروجين (H_2S) يدل على وجـــود الكبريت والهيدروجين (H,S).



الكشوفات اللونية للبروتينات والأحماض الأمينية

(1) كشف بايوريت Biuret test

وهو كشف عام عن البروتينات فقط (أي المركبات التي تحتوي على أكثر من آصرتين ببتيديتين) فأكثر من أواصر متعدد الببتيد، لذا فان جميع الأحماض الأمينية تعطي نتيجة سالبة (-ve) مع بايوريت.

كشف بايوريت يعتبر من أهم الكشوفات اللونية عن البروتينات حيث تتفاعل هذه المركبات (الحاوية على آصرتين أو أكثر من متعدد الببتيد) مع كاشف بايوريت وتعطي لون بنفسجي أو وردي.

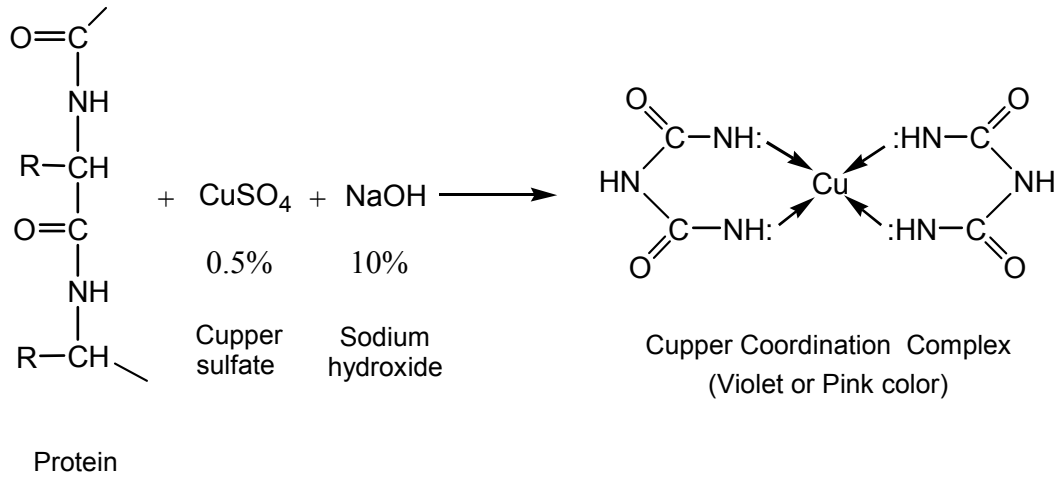
مكونات كشف بايوريت: (كبريتات النحاس $CuSO_4$ + هيدروكسيد الصوديوم NaOH)

H.w

- هناك بعض الجزيئات غير بروتينية مثل اليوريا تعطي نتيجة موجبة مع كشف بايوريت؟ أذكر السبب معززاً إجابتك بالمعادلات.

مبدأ الكشف

تتفاعل البروتينات مع كبريتات النحاس $CuSO_4$ القاعدية لتكون معقد بنفسجي اللون بوجود قاعدة قوية NaOH.



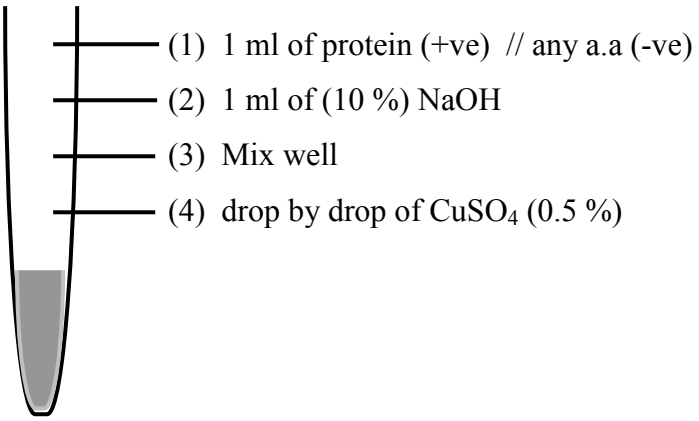
ملاحظة:

نتجنب الزيادة من كبريتات النحاس $CuSO_4$ لأن هذه الزيادة تعطي اللـــون الأزرق الناتج من تكون هيدروكسيد النحاسيك $Cu(OH)_2$ والذي يتداخل مع اللون البنفسجي وبالتالي تعتبر النتيجة خاطئة.

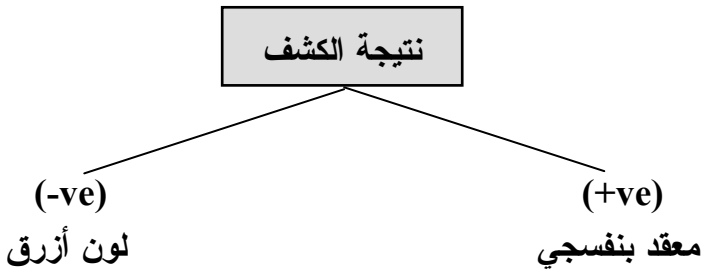
$$CuSO_4 + 2NaOH \longrightarrow Na_2SO_4 + Cu(OH)_2$$

طريقة العمل:

(a.a تعني amino acid أحماض أمينية)



مع مراعاة الرج والتحريك المستمر عند إضافة كل قطرة لأنه في حالة عـــدم الـــرج سوف يتراكم اللون الأزرق وأحياناً يترسب.



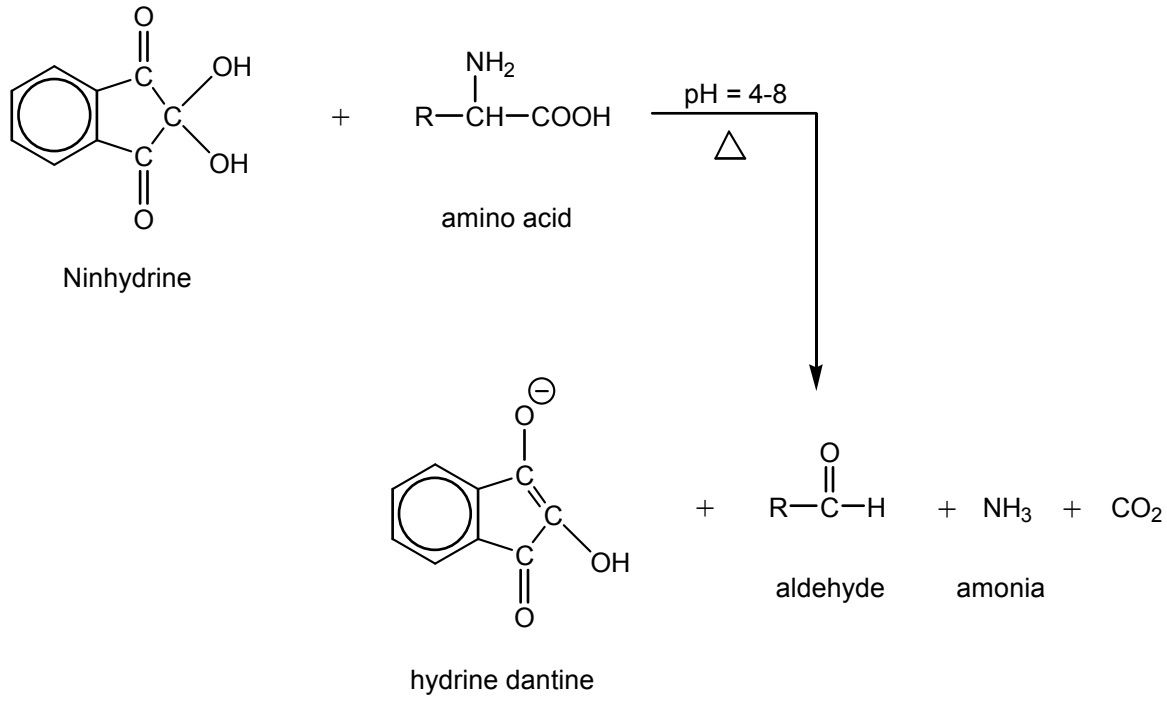
جميع البروتينات تعطي لون بنفسجي ماعدا الجيلاتين Gelatin يعطي لون بنفـــسجي مزرق لأن عدد الأواصر الببتيدية كثيرة جداً. والببتون يعطي لون وردي لأنه بروتين مشتق إذن تعتمد شدة اللون على عدد الأواصر الببتيدية الموجودة في البروتين.

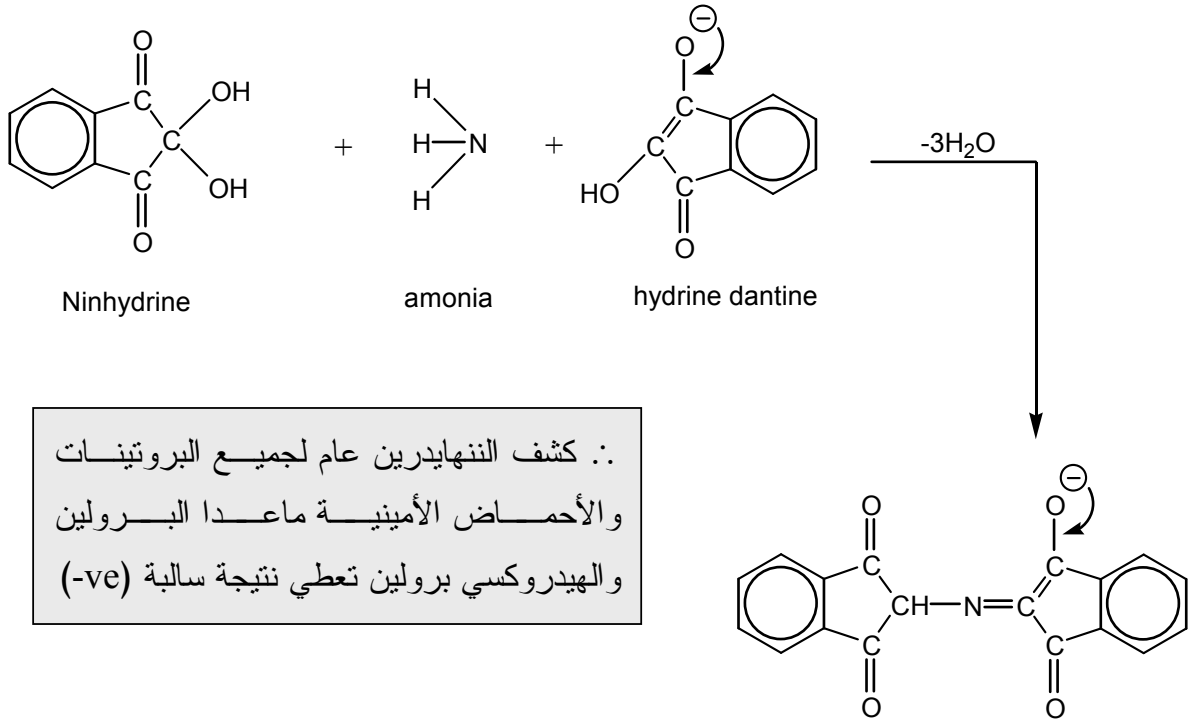
(2) كشف النينهايدرين Ninhydrine test

وهو كشف عام لجميع البروتينات والأحماض الأمينية إذ تعتمد نتيجة الكشف الموجبة على وجود مجموعة الفا–أمين α-NH_2 . لهذا فان جميع الأحماض الأمينيـــة والبروتينـــات تعطي نتيجة موجبة مع النينهايدرين (لون ارجواني)، ماعدا البرولين والهيدروكسي برولين إذ تعطي نتيجة سالبة (ve–). لماذا؟

مبدأ الكشف:

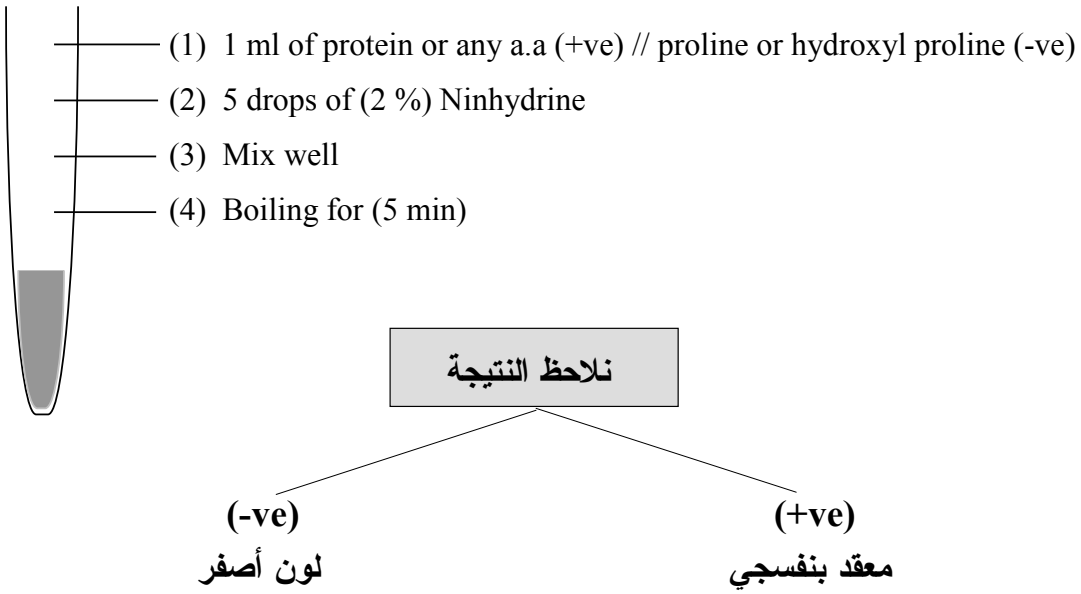
يعتبر النينهايدرين مادة مؤكسدة قوية جداً تعمل على أكسدة الحامض الأميني منتجـــة CO_2 و NH_3 والديهايد. والنينهايدرين المختزل هو هيدرين دانتين (hydrine dantine) بعد ذلك يتفاعل مع الأمونيا المتحررة مكوناً معقداً أزرق اللون أو بنفسجي ويجري الكشف عنـــد (pH=4-8).





∴ كشف النهايدرين عام لجميع البروتينات والأحماض الأمينية ماعدا البرولين والهيدروكسي برولين تعطي نتيجة سالبة (-ve)

طريقة العمل: نأخذ أولاً أنبوبة اختبار نظيفة ثم نجري الخطوات التالية:



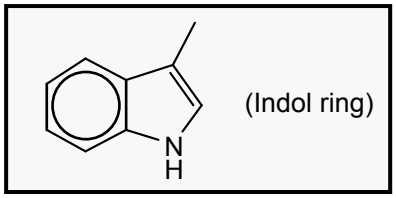
ملاحظة:

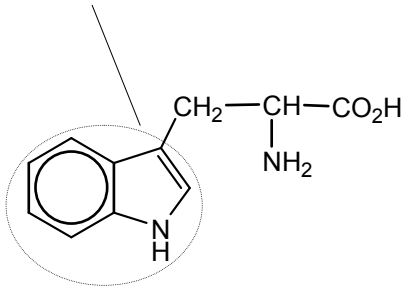
تستخدم هذه الطريقة للتقدير الكمي لتركيز الحامض الأميني في المحلول.

(3) كشف هوبكن كول Hopkin Cole test
ويدعى أيضاً Glyoxylic acid Reaction

مبدأ الكشف:

وهو كشف (خاص) بالتربتوفان Tryptophan والبروتين الحاوي على التربتوفان لأن مجموعة الأندول الموجودة في التربتوفان تتفاعل مع حامض الكلايوكسليك بوجود حامض الكبريتيك المركز (H_2SO_4) لينتج حلقة ارجوانية في البروتينات أو حلقة صفراء في حالة التربتوفان لوحده.



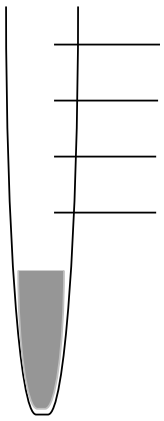


Tryptophan

+ *Glyoxylic acid* $\xrightarrow[\text{Conc.}]{H_2SO_4}$ Purple Ring / or Yellow

حلقة ارجوانية أو صفراء

طريقة العمل:



(1) 1 ml of Try. Or Alb. Peptone (+ve) // Gel. (-ve)

(2) 1 ml of glacial acetic acid (حامض الخليك الثلجي)

(3) Mix well

(4) drop by drop H_2SO_4 (conc.) ≈ 1 ml

ملاحظة:

- يضاف حامض الكبريتيك المركز (H_2SO_4) على جوانب أنبوبة الاختبار لغرض تكوين طبقتين.
- عند عدم ظهور الحلقة نعرض أنبوبة الاختبار للحرارة.

H.w

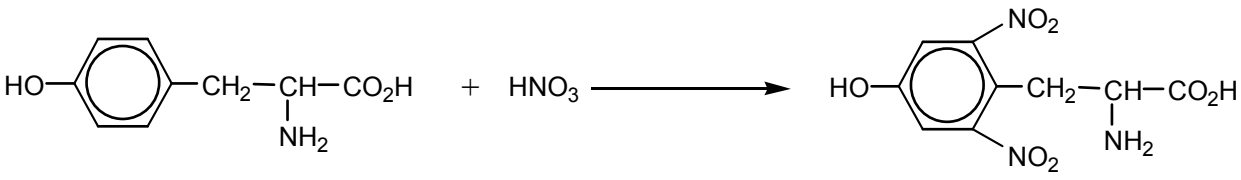
- **لماذا الجيلاتين يعطي نتيجة سالبة (-ve) مع هوبكن كول؟**

(4) كشف الزانثوبروتك Xanthoproteic test

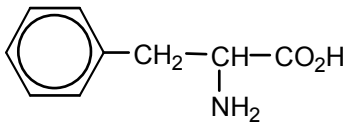
يعتمد هذا الكشف على وجود حلقة البنزين (Benzene ring) ويمكن من خلال هـذا الكشف التمييز بين الأحماض الأمينية الأروماتية (+ve) والأحماض الأمينية الاليفاتية (-ve).

مبدأ الكشف:

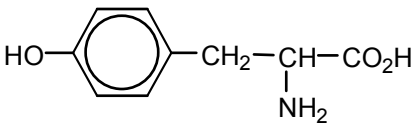
يتم الكشف بتفاعل حامض النتريك المركز (HNO_3 conc.) مع الحـامض الأمينـي ليعطي لون أصفر يتحول إلى اللون البرتقالي، إذ يحدث عملية نيتـرة (Nitration) وهـي عبارة عن عملية إدخال مجموعة نيترو (NO_2) إلى المركب ليكون اللون الأصفر وبوجـود الأمونيا يتحول إلى اللون البرتقالي.



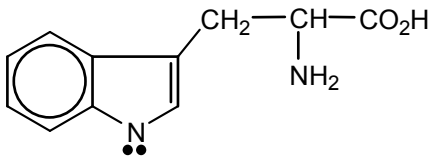
قسم من الأحماض الأمينية الأروماتية



Phenyl alanine
فنيل الانين

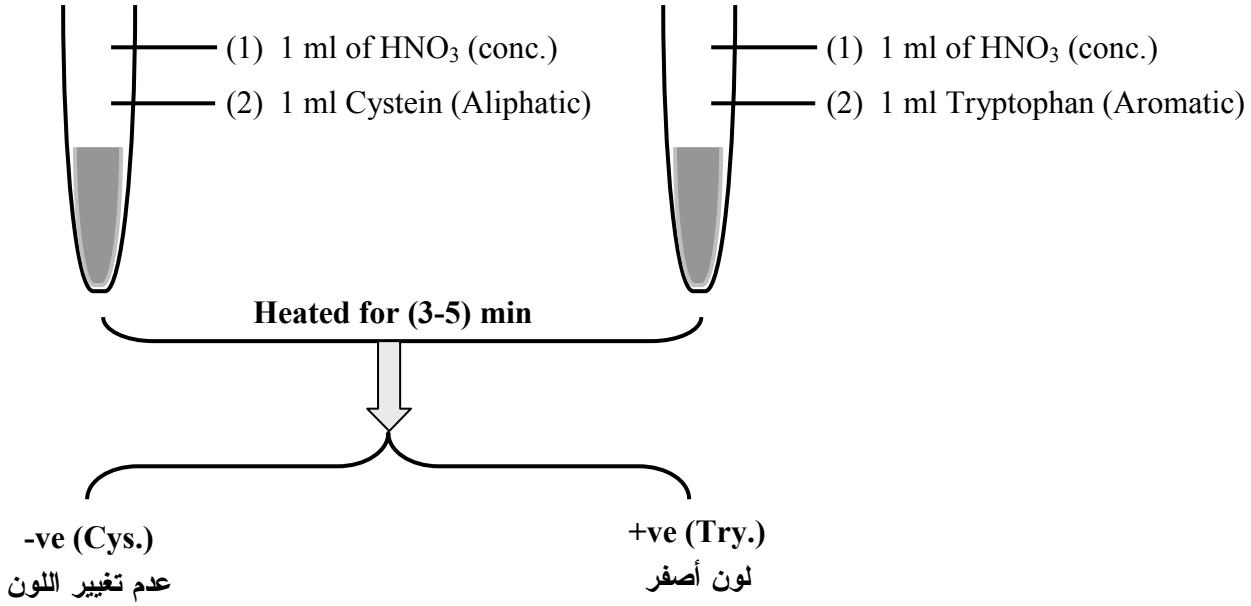


Tyrosine
تايروسين



Tryptophan
تربتوفان

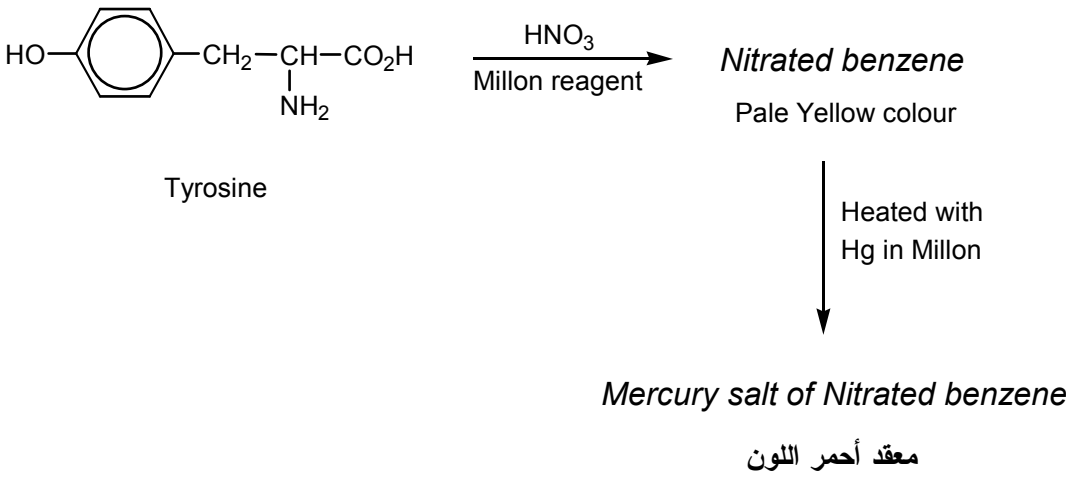
طريقة العمل:



(5) كشف ميلون Millon's test

يستعمل هذا الاختبار لتشخيص الحامض الأميني التايروسين (Tyrosine) وهو نوع من الأحماض الأمينية التي تتميز باحتوائها على مجموعة الفينول المتكونة من (Benzene ring + OH) أي حلقة بنزين + مجموعة هيدروكسيل، حيث يعطي لون أحمر نتيجة تفاعله مع نترات الزئبقيك المذابة في حامض النتريك ($Hg(NO_3)_2$ in HNO_3)

مكونات كاشف ميلون: يتكون من (HNO_3 و Hg)



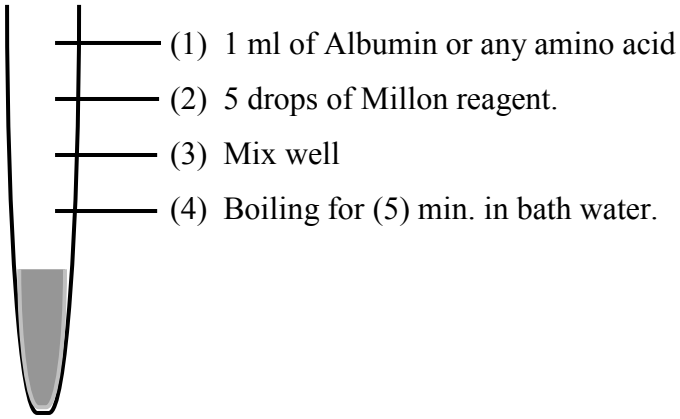
طريقة العمل:

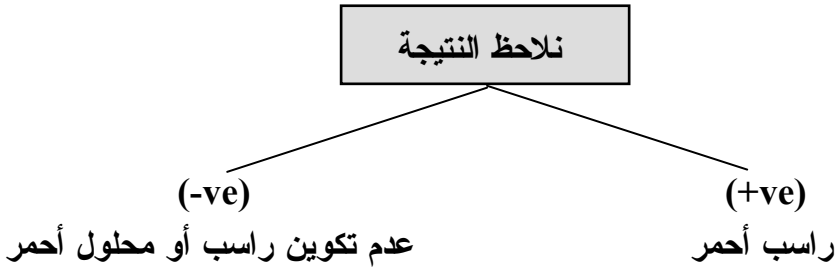
(1) يضاف (1 ml) من الحامض الأميني أو الألبومين في أنبوبة اختبار نظيفة.

(2) تضاف (5) قطرات من كاشف ميلون (Millon reagent).

(3) يرج المحلول جيداً.

(4) يسخن المزيج لمدة (5) دقائق في حمام مائي لينتج راسب أحمر.





ملاحظة:

1) عند تكون راسب أحمر فذلك يدل على وجود التايروسين في جزيئات البروتين.

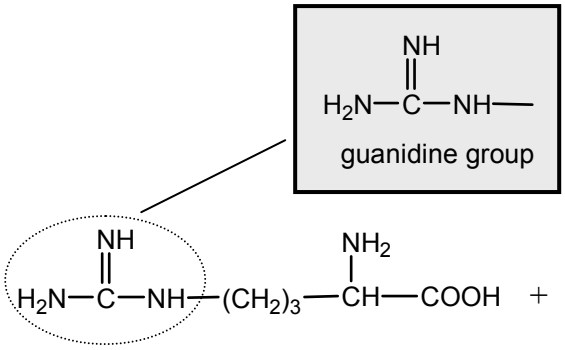
2) عند تكون محلول أحمر وليس راسب فذلك يدل على وجود الحامض الأميني (التايروسين) لوحده.

H.w

- هل يعطي الحامض الأميني فنيل الانين (phenyl alanin) كشف موجب (+ve) ولماذا؟

(6) كشف ساكاكوجي Sakaguchi's test

وهو كشف (خاص) عن الحامض الأميني الأرجنين (Arginine) والذي يحتوي على الكواندين حيث يعطي هذا الكشف لون أحمر عند تفاعله مع α-نفثول وعامل مؤكسد (Br_2/H_2O).



مكونات كاشف ساكاكوجي: يتكون من α-naphthol و NaOH و Br_2/H_2O

ملاحظة:

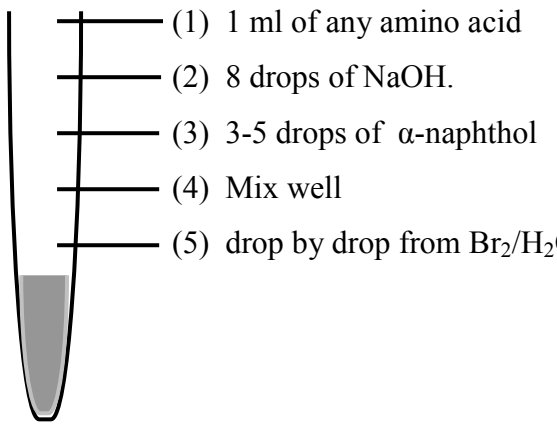
لا نضيف زيادة من ماء البروم لكي لا يحصل تداخل في اللون يؤدي إلى نتيجة خاطئة.

H.w

- هل يستخدم هذا الكشف لجميع البروتينات. ولماذا؟

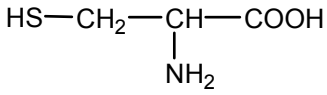
طريقة العمل:

1) نأخذ (1 ml) من الحامض الأميني في أنبوبة اختبار نظيفة.
2) نضيف (8) قطرات من هيدروكسيد الصوديوم.
3) بعد ذلك يضاف (3-5) قطرات من α-naphthol وبعدها يرج المحلول جيداً.
4) نضيف قطرة قطرة من ماء البروم لحين ظهور اللون الأحمر البراق.



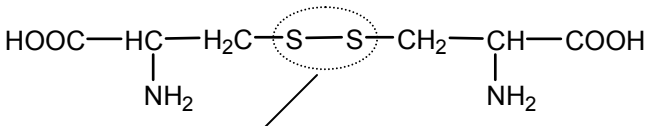
(7) كشف السستين ـ السستاين Cysteine - Cystine test

إن الأحماض الأمينية التي تحتوي على مجموعة الثايول Thiol (SH) تعطي نتيجة موجبة مع هذا الكشف مثل السستين (Cystein).



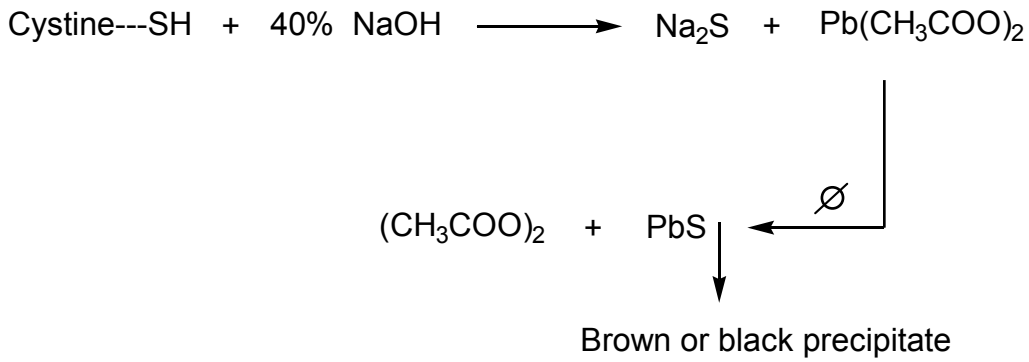
Cystein سستين

كما يعطي السستاين كشف موجب (+ve) بالرغم عدم احتوائه على مجموعة الثايول إلا انه يحتوي على آصرة ثنائي الكبريتيد التي تتفكك بسهولة عند التسخين لينتج مجاميع الثايول.



Cysteine سستاين

Disulphide bridge
جسر ثنائي الكبريتيد



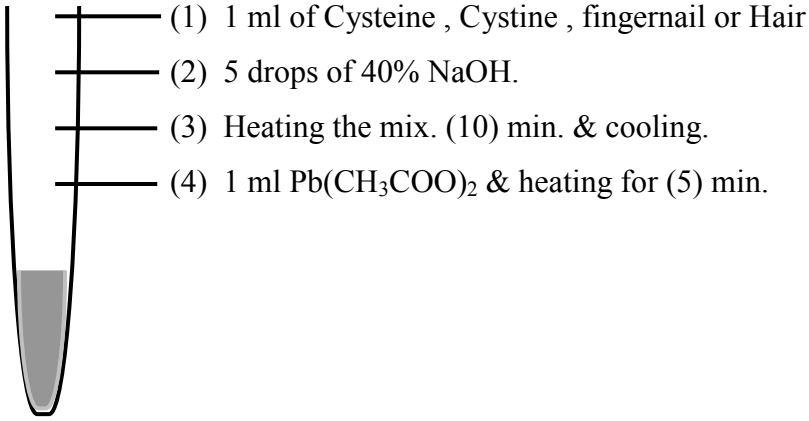
مبدأ العمل:

الكبريت الموجود في الجزء العضوي سوف يتحول إلى الجزء اللاعضوي وبالتسخين مع هيدروكسيد الصوديوم (40 % NaOH) وإضافة خلات الرصاص يتكون الراسب الأسود أو القهوائي.

يحتوي [الألبومين – الشعر – الأظافر – الصوف – الخشب] على كميات كبيرة من السستين والسستاين لذلك تعطي نتيجة موجبة (+ve) وتعتمد شدة اللون (لون الراسب) على نوعية وكمية الحامض الأميني في العينة المستخدمة.

طريقة العمل:

1) نأخذ (1 ml) من السستين أو الشعر أو الأظافر.
2) يضاف (5) قطرات من هيدروكسيد الصوديوم NaOH % 40.
3) يسخن المزيج لمدة (10) دقائق ثم يبرد.
4) يضاف (1ml) من خلات الرصاص ثم يسخن المحلول لمدة (5) دقائق إذ يتكون راسب أسود أو بني اللون.



H.w

- هل يعطي المثيونين نتيجة موجبة (+ve) مع كشف السستين - السستاين. ولماذا؟

مخطط تشخيص مادة مجهولة (بروتين ، أحماض أمينية)

(بروتينات + أحماض أمينية)

Alb. / Arg. / Cyste. / Try. / Tyr. / Pro.

برولين تايروسين تربتوفان سستين ارجنين البومين

كشف بايوريت Biuret

للتمييز بين البروتينات والأحماض الأمينية

البروتينات (+ve)
مثل الألبومين ، كلوبيولين ، الجيلاتين
(معقد بنفسجي اللـــون)

الأحماض الأمينية (-ve) **(لـــون أزرق)**
هيدروكسي برولين ، برولين ، تايروسين ، تربتوفان ، سستين ، ارجنين

اختبار التسخين والتجلط heat test

Alb. (+ve)

كشف النهايدرين Ninhydrine

(+ve) **موجب (معقد بنفسجي اللون)**
تايروسين ، تربتوفان ، سستين ، أرجنين
(جميعها تحتوي α-NH_2)

(-ve) **سالب (لون أصفر)**
برولين أو هيدروكسي برولين
(لا تحتوي α-NH_2)

كشف ميلون Millon's

(+ve) **موجب (معقد أحمر اللون)**
تايروسين
(حامض أميني يحتوي على مجموعة فينول)

(-ve) **سالب (عديم اللون)**
تربتوفان ، سستين ، أرجنين
(أحماض أمينية لا تحتوي على مجموعة فينول)

كشف الزانثوبروتك Xanthoproteic

(+ve) **موجب (أصفر إلى برتقالي اللون)**
تربتوفان

للتأكيـــد

كشف هوبكن كول Hopkin Cole

(+ve) **موجب**
حلقة صفراء
تربتوفان

(-ve) **سالب**
لا يتكون حلقة صفراء

(-ve) **سالب (عديم اللون)**
سستين ، أرجنين

كشف ساكاكوجي Sakaguchi

كشف خاص عن الأرجنين

كشف السستين- الستاين Cystine-Cysteine

كشف خاص عن السستين